

УДК УДК 60-7, 606

## УДОСКОНАЛЕННЯ БІОТЕХНОЛОГІЧНОЇ СХЕМИ ВИРОБНИЦТВА РЕКОМБІНАНТНОЇ ВАКЦИНИ ДЛЯ ПРОФІЛАКТИКИ ВІРУСУ ПАПІЛОМИ ЛЮДИНИ

**Ю.О. ЗАГАЙНОВА<sup>1\*</sup>, І.А. БЄЛИХ<sup>2</sup>**

<sup>1</sup>магістрант кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, НТУ «ХПІ», Харків, Україна

<sup>2</sup>доцент кафедри біотехнології, біофізики та аналітичної хімії, кандидат біологічних наук, НТУ «ХПІ», Харків, Україна

\*email: yul.taranenko@gmail.com

Рак шийки матки на сьогодні є однією з найбільш розповсюджених злоякісних пухлин у жінок. В Україні частота захворювання становить близько 9 тисяч випадків на 100 тисяч населення. Причиною онкологічних захворювань, зокрема раку шийки матки є вірус папіломи людини (ВПЛ) [1].

ВПЛ – це віруси, що викликають папіломи, кондиломи, дисплазію, рак шийки матки або передракові патологічні стани [1].

Зараз в Україні використовуються дві вакцини проти ВПЛ типу 16 та 18, які пройшли всі клінічні випробування і довели свою ефективність. Вважається, вакцини більш дієві, якщо вакцинація проводиться до впливу ВПЛ (найкраще до першого сексуального контакту). Ці вакцини не лікують ВПЛ або хвороби пов'язані з ВПЛ, але використовуються в профілактичних цілях і дозволяють запобігти розвитку онкологічних захворювань [1].

Вакцина для профілактики ВПЛ – рекомбінантна, виготовлена з високоочищених неінфекційних вірусоподібних часток основного білка L1 оболонки ВПЛ 16 і 18 типів. Вірусоподібні частки не містять вірусної ДНК, тому вони не можуть інфікувати клітини, але вони викликають імунну відповідь та формують клітинну імунну пам'ять [1, 2].

Метою дослідження є удосконалення біотехнологічної схеми виробництва вакцини проти ВПЛ.

Для отримання рекомбінантних білків HPV представлені приклади використання дріжджів *Saccharomyces cerevisiae*, які є міжнародно визнаними безпечними та здатними до вироблення великої кількості білка в нативній конформації. Проте недоліком є нестабільність рекомбінантних клітин, що пов'язана з відносно високою частотою втрат автономної плазмідки при поділі клітин. Також відоме отримання рекомбінантних білків HPV з використанням рекомбінантних штамів-продуцентів білка HPV16-L1 *Pichia angusta* ВКМУ-2988D та HPV18-L1 *Pichia angusta* Y-2989D. Ці штами мають високу продуктивність, але не забезпечують отримання оптимального антигену. Можливе одержання вакцини проти ВПЛ з використанням дріжджів *Hansenula polymorpha*. Перевагою даного штаму є можливість отримання стабільно високого рівня синтезу цільового білка без порушення ефективності його

укладки. Використання експресійних касет з двома різними промоторами (МОХ та ДАК) забезпечує велику рівномірність синтезу продукту в процесі культивування [2].

Білки HPV16-L1 та білки HPV18-L1 отримують окремо, в 2 біореакторах.

Отримують плазмідний вектор раМ547, що містить рекомбінантний ген ДАК-HPV16-L1 і селективний маркер ген LEU2 *Saccharomyces cerevisiae* [2].

Фрагмент ДНК ДАК-HPV16 і препарат плазмиди гідролізують рестриктазами BsrGI і HindIII. Отримані препарати фрагменту ДНК з рекомбінантним геном і плазмиду вносять в реакційну суміш для проведення «зшивання». Після інкубації з Т4 лігазою протягом 2 годин, 2 мкл реакційної суміші використали для трансформації штаму *Escherichia coli*. З декількох трансформатів виділили плазмідну ДНК. На основі рестрикційного аналізу відбирають плазмиду з фрагментом ДАК-HPV16[2].

Аналогічно отримують плазмідний вектор рКАМ539А, що містить рекомбінантний ген МОХ-HPV16-L1 і неповний ген – селективний маркер TRP3 *Hansenula polymorpha* [2].

Здійснюють культивування рекомбінантних клітин *Hansenula polymorpha*, що містять дві експресійні касети (одна з промотором МОХ, ін. – з ДАК) в два етапи. На першому етапі при температурі 30°C нарощують біомасу в культуральному середовищі, що складається з 4 % дріжджового екстракту, 2 % бактопептону і 4 % гліцерину. Приблизно через 28–32 години ферментації додають індуктор до концентрації 0,5–0,8 % і підтримують на цьому рівня 48–72 години [2].

Після ферментації рекомбінантних клітин білок HPV16-L1 та білок HPV18-L1 виділяють згідно з методикою. Клітини з культуральної рідини осаджують центрифугуванням при 4000 g протягом 15 хвилин при 4°C. Для видалення основної маси нецільових білків і виділення антигену отриманий екстракт насичують сульфатом амонію до 45 % і далі осаджені білки центрифугують при 1200 g протягом 30 хвилин. Фракції, які містили антиген, концентрують ультрафільтрацією, розділяють за допомогою зонального центрифугування та очищають за допомогою гелю фільтрації. Чистоту отриманого таким чином білка визначають методом електрофорезу [2].

Одним з найбільш ефективних є біотехнологічне одержання за допомогою штаму дріжджів *Hansenula polymorpha*. Це обмежений вид дріжджів, які використовують метанол та Карбон в якості єдиного джерела енергії [2].

Перевагами даної технології є [1]: отримання вакцини з підвищеною імуногенністю; можливість контролювати відсутність мутацій в експресованих генах; зниження енерго- та капіталовитрат [1].

#### Список літератури:

1. Тараненко Ю.О. Біотехнологія виробництва рекомбінантних вакцин проти вірусу папіломи людини: дипл. проект / Ю.О. Тараненко. – Харків, 2018. – 66 с.
2. Патент RU2546243C1. Рекомбинантная вакцина для профилактики папилломавирусной инфекции человека и способ ее получения / М.А. Крымский, И.А. Борисов, М.С. Яковлев, М.О. Агафонов, М.Д. Тер-Аванесян. Заявл. 13.02.2014. Оpubл. 10.04.2015.